

Antioxidant activity and physicochemical composition of fermented *Vigna angularis* using *Bacillus subtilis* KCCM 11965P

Kyung Ok Jeong, Keun Su Oh, Kwang Hyun Moon, Dae Geun Kim, So Yeon Im, Eun Ji Lee, Na Ri Kim, Wook Kim, Hae Jin Kim, Jeong Ho Lee*

Sunchang Research Institute of Health and Longevity, Sunchang 56015, Korea

***Bacillus subtilis* KCCM 11965P를 이용한 붉은팥 발효물의 항산화 활성 및 이화학적 성분 분석**

정경옥 · 오근수 · 문광현 · 김대근 · 임소연 · 이은지 · 김나리 · 김욱 · 김해진 · 이정호*

(재) 순창건강장수연구소

Abstract

Health of human intestine has deteriorated due to excessive stress and western diet. In this study, *Vigna angularis* was fermented by *Bacillus subtilis* KCCM11965P in order to develop prebiotic resource for improving bowel movement. The contents of ash and crude protein were $3.35 \pm 0.04\%$ and $21.1 \pm 0.19\%$ respectively. *Vigna angularis* extract (1, 3, 5%) were incubated with 3% (v/v) *Bacillus subtilis* KCCM 11965P for 0, 24, 48, and 72 h. Total bacterial numbers showed that the combination of 3% powdered seeds and 72 h incubation time was optimum condition for this experiment. Total polyphenol content increased from 0.18 ± 0.010 mg/mL in pre-incubation to 0.23 ± 0.007 mg/mL in post-incubation with the condition mentioned above. DPPH radical scavenging activity also increased from $36.1 \pm 6.0\%$ to $63.6 \pm 5.2\%$. Analysis of protease activity showed 2.69 ± 0.003 unit/mL in combination of 5% powdered seeds and 72 h incubation time. Amylase activity increased from 1.0 ± 0.1 unit/mL in pre-incubation to 26.0 ± 0.2 unit/mL in post-incubation. The analysis of free amino acids after incubation with *Bacillus subtilis* KCCM 11965P showed that leucine increased from 5.22 mg/L to 67.59 mg/L and tyrosine, one of non-essential amino acid also increased 10.08 mg/L to 259.35 mg/L by incubation with 5% powdered seeds. Most of organic acid were reduced by incubation for 72 h. These results suggest that *Vigna angularis* could be utilized most as a prebiotic resources.

Key words : fermentation, *Bacillus subtilis* KCCM 11965P, prebiotic, *Vigna angularis*, antioxidant activity

서 론

현대인들의 과도한 스트레스, 서구화된 식생활, 과도한 영양섭취, 정제된 곡류를 이용한 가공식품, 육류 섭취량 증가 등으로 인하여 소화기관의 기능 저하, 과체중 등 소화기관 질환이 증가함에 따라 장 건강에 대한 관심이 고조되

면서 프리바이오틱스에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1-3).

프리바이오틱스(prebiotics)는 장 건강에 유익한 미생물의 성장이나 활성을 촉진함으로써, 숙주 건강에 좋은 효과를 나타내는 것이다(4,5). 프리바이오틱스는 가공 중에 열 분해되지 않아야 하며, 섭취 후 소장에서 소화되지 않고 대장까지 변형되지 않은 상태로 이동하여 장내 유용 세균의 성장과 촉진, 보호 작용을 갖는 비소화성 성분으로 장내 세균의 면역 증강, 호르몬 균형, 알리지 예방 등의 기능이 있는 것으로 알려져 있다(5,6). 프리바이오틱스는 낮은 투여량으로 장내 유용 세균이 선택적, 효율적으로 활용되어야 하고 부작용이 없어야 하며, 고분자량이며 발효 속도가

*Corresponding author. E-mail : wooju1119@naver.com
Phone : 82-63-653-8708, Fax : 82-63-653-8710
Received 16 November 2017; Revised 28 November 2017;
Accepted 29 November 2017.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

늦어 장 말단까지 이동되어야 하고 독소의 응착을 방해하는 기능과 독소를 저해하는 기능 등을 갖추어야 한다(4,6).

발효는 미생물을 이용하여 유기물을 분해시키는 것으로 유효성분의 증가, 흡수율의 증가 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 영양성분을 유지하면서 미생물이 분비하는 각종 가수분해효소와 세포 내 조직에 결합되어 있는 생리활성 물질들이 유리화되면서 생체이용률을 향상시킨다(7-9). 식품의 발효는 미생물 작용을 통해 식품에 좋은 맛과 향, 조직감 등을 부여하며, 독성물질 파괴, 생리활성물질 생산, 소화증진 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(3,10,11). 식품의 발효에 이용되는 균주는 *Aspergillus oryza*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* 등이 있다(12-14). *Bacillus* 속의 균주는 α -amylase, protease를 분비하므로 이들 효소의 생산에 이용되기도 하며, 이를 이용해 발효시킨 식품의 항산화활성 등이 증가한다(12).

붉은팥(적두, *Vigna angularis*)은 장미목 콩과의 한해살이 식물로, 한국, 중국, 일본 등의 동북아시아에서 주로 재배되며, 국내에서 두류 중 콩 다음으로 수요가 많은 작물로서 영양적으로 매우 우수하다(15,16). 붉은팥에는 비타민, 칼륨, 칼슘, 인, 라이신 등을 함유하고 있어 각기병 및 피로회복에 효과가 있으며, 아미노산이 풍부하여 단백질 생산을 도와주고 탄수화물 대사 촉진 등에 유익한 기능을 갖추고 있어 영양보충용 식품소재로 많이 이용되고 있다(16-17). 한방에서는 붉은팥을 적소두하여 설사, 이질, 수종, 비만, 신장병, 각기병, 숙취 등에 효능이 있으며, 붉은팥 삶은 물은 이뇨 및 배변에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 붉은팥에 함유된 사포닌은 섬유질과 함께 배변을 원활하게 하여 배변을 촉진하여 장을 좋게 한다(17).

본 연구에서는 식품 발효에 이용되고 있는 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P를 이용하여 붉은팥(적두, *Vigna angularis*)을 발효한 후 발효시간에 따른 균수변화, 항산화활성, protease 효소 활성, α -amylase 효소 활성, 유리아미노산, 유기산 등을 분석하여 장 건강에 유익한 프로바이오틱스(probiotics)를 활성화시킬 수 있는 프리바이오틱스(prebiotics) 소재를 개발하기 위한 기초연구로 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 붉은팥은 2016년 전북 순창군에서 재배된 것을 순창군에 소재한 순창농산물직판장에서 구입하여 빛깔, 모양 등 외부 형태를 확인하였으며, 동결건조기를 이용하여 건조한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다.

일반성분 분석

분쇄한 붉은팥의 일반성분은 AOAC(16)법으로 분석하

였다. 수분은 105℃ 상압가열건조법, 회분은 550℃ 직접회화법, 조단백질은 자동질소증류장치를 이용한 Kjeldahl법, 조지방은 자동지방추출장치를 이용한 Soxhlet 추출법으로 분석하였다.

Bacillus subtilis KCCM 11965P 발효 및 균수 측정

발효에 사용한 균주는 재단법인 발효미생물산업진흥원에서 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P를 분양받아 LB broth(Difco Co., New Jersey, MD, USA)를 배지로 사용하여 30℃의 진탕배양기에서 200 rpm, 18시간 진탕배양 한 후 실험에 사용했다. 붉은팥의 발효는 붉은팥 원물을 1%, 3%, 5%를 각각 제조한 후 배양된 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 3% (v/v)에 접종하였다. 발효는 3일간(30℃, 200 rpm) 진행했으며 0, 24, 48, 72시간마다 시료를 채취하여 실험하였다. 총 균수는 각 시료 1 mL에 멸균 생리식염수를 이용하여 10진 희석법으로 10단계로 희석한 후 희석액을 LB plate count agar로 배양(30℃, 12시간)한 후 계수하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법(19)을 이용하여 측정하였다. 붉은팥 발효액 100 μ L에 95% 에탄올 100 μ L, 증류수 500 μ L와 50% Folin-Ciocalteu phenolic reagent 50 μ L을 넣고, 실온에서 5분 동안 반응시킨 후 5% Na₂CO₃ 100 μ L를 첨가한 다음 빛을 차단한 상태로 상온에서 1시간 반응시킨 후 microplate reader system(Infinite M200pro, Tecan Co., ZH, Austria)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 표준곡선($y=0.0024x+0.0323$, $R^2=0.9981$)으로부터 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH) 라디칼 소거활성은 Blois(20)의 방법을 변형하여 측정하였다. 발효액 100 μ L에 0.4 mM DPPH 용액 100 μ L를 가한 다음 빛을 차단한 상태로 실온에서 30분간 방치 후 microplate reader system을 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군과 대조군의 흡광도를 구하여 아래와 같이 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Protease 효소 활성 측정

Protease 효소활성측정은 Kim(21)의 방법을 변형하여 측정하였다. 1.25 mL의 0.65% (w/v) casein buffer(casein 6.5 g/mL, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5)를 37℃에서 5 분간 반응시킨 후 발효액 0.5 mL를 첨가하여 37℃에서

10분간 반응시켰다. 110 mM의 trichloroacetic acid 2.5 mL 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 37°C에서 30분 동안 방치한 후 침전물을 0.45 µm syringe filter로 여과하였다. 이와 같은 방법으로 기질 및 TCA를 처리 후 시료 0.5 mL을 첨가한 것을 blank로 사용하였다. 여과액 2 mL에 500 mM sodium carbonate solution 5 mL 와 0.5 M Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 UV-spectrophotometer(Specord 200 Plus, Analytikjena Co., Konrad, Germany)를 이용하여 흡광도 660 nm에서 측정하였다. 표준물질은 L-tyrosine을 단계적으로 희석하여 동일한 방법으로 분석 후 얻은 표준곡선을 이용하였으며, 1 unit는 1분 동안 tyrosine 1 µg을 유리시키는 양을 환산하여 계산하였다.

α-Amylase 효소 활성 측정

α-Amylase의 효소활성측정은 Bernfeld(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. 250 µL의 1.0% (w/v) Soluble starch solution(20 mM sodium phosphate buffer에 6.7 mM sodium chloride, pH 6.9, 37°C)에 발효액 500 µL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 96 mM dinitrosalicylic acid(DNS) solution을 0.5 µL을 첨가하여 100°C에서 5분 동안 반응시켜 4°C에서 3분간 방치 한 후 UV-spectrophotometer로 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 이와 같은 방법으로 기질 및 DNS를 처리 후 발효액 500 µL을 첨가한 것을 blank로 사용하였다. 표준곡선은 0.2% (w/v) maltose을 이용해 작성하였으며, 효소활성도(unit definition)는 위의 조건(37°C, pH 6.9)에서 starch로부터 1분 동안에 생성되는 1.0 µg의 maltose양을 1 unit 정의하였다.

유리아미노산 분석

유리아미노산은 Ohara 등(23)의 방법에 따라 분석하였다. 60 mesh로 마쇄한 시료 5 g을 50 mL 정용하여 30°C water bath에서 30분간 진탕한 후 800 ×g에서 30분간 원심분리한 다음 상등액 10 mL에 sulfosalicylic acid 25 mg을 첨가하여 4°C에서 4시간 동안 방치한 후 20,400 ×g에서 30분간 원심분리하였다. 상등액을 0.22 µm membrane filter로 여과한 여액의 유리아미노산을 분석하였다. 분석은 amino acid analyzer(Sykam 433, Sykam Co., Eresing, GB, Germany)로 분석하였으며, column은 Cation Separation Column(LCAK60/Na 4.6×150 mm), buffer solution은 pH 3.3, pH 4.2, pH 5.3, pH 10.1 sodium citrate, reagent flow rate 0.25 mL/min, buffer flow rate 0.45 mL/min, column temperature 50-80°C, injection volume 100 µL로 유리아미노산을 분석하여 외부 표준법으로 계산하였다.

유기산 분석

유기산 분석은 Palmer 등(24)의 방법에 따라 분석하였다.

발효액을 0.45 µm membrane filter로 여과한 여액을 HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC(Nanospace SI-2, Shiseido Co., Tokyo, Japan), detector(340C ELSD, Thermo Fisher Scientific Co., California, SU, USA), Rspak KC-811 column(300 mm L×8 mm, Showa Denko Co., Tokyo, Japan)를 사용하였으며, 분석조건은 column temperature 40°C, mobile phase 70% acetonitrile isocratic, flow rate 1.0 mL/min, detection wavelength 220 nm, pressure 40 psi, injection volume 20 µL로 분석하였다.

통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 처리값의 차이 유무를 one-way ANOVA(analysis of variation)로 분석한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

일반성분 분석

본 실험에 사용된 붉은팥은 2016년 전북 순창군에서 재배된 것을 순창군에 소재한 순창농산물직판장에서 구입하여 AOAC법으로 일반성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 수분은 14.4±0.14%로 분석되었으며, 회분은 3.35±0.04%, 조단백질은 21.1±0.19%, 조지방은 0.35±0.02% 함유된 것으로 분석되었다. Kim 등(25)의 연구에서 흑태콩(Huktae)의 수분은 11.5%로 분석되었으며, 회분 5.36%, 조단백질 41.1%, 조지방 15.8%로 분석된 자료와 비교한 조단백질과 조지방 등의 함량은 낮게 나타났으나 이는 품종의 차이에 의한 것으로 판단된다.

Bacillus subtilis KCCM 11965P 발효에 따른 균수 변화

발효에 사용한 균주는 재단법인 발효미생물산업진흥원에서 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P을 분양받아 실험에 사용하였다. 붉은팥 원물 1%, 3%, 5%와 *Bacillus subtilis*

Table 1. Proximate composition of *Vigna angularis*

Proximate composition	Content (%)
Moisture	14.4±0.14 ¹⁾
Ash	3.35±0.04
Crude protein	21.1±0.19
Crude lipid	0.35±0.02

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

KCCM 11965P 3% (v/v)에 접종하여 24, 48, 72시간 배양한 후 총균수를 10진 희석법으로 계수하였다(Table 2). 붉은팥 원물 3% 첨가한 후 24시간 배양한 군에서는 $0.04 \pm 1.1 \times 10^7$ CFU/mL으로 측정되었으며, 48시간 배양한 군에서는 $7.0 \pm 1.0 \times 10^7$ CFU/mL, 72시간 배양한 군에서는 $12.7 \pm 1.6 \times 10^7$ CFU/mL으로 24시간 배양군에 비해 310배 증식하였다. 붉은팥 원물 5% 첨가한 후 24시간 배양한 군에서는 $0.04 \pm 1.1 \times 10^7$ CFU/mL으로 측정되었으며, 48시간 배양한 군에서 $1.1 \pm 0.7 \times 10^7$ CFU/mL, 72시간 배양한 군에서는 $11.6 \pm 0.2 \times 10^7$ CFU/mL으로 24시간 배양군에 비해 290배 증식하였다. 붉은팥 원물 3% 첨가군에서 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 증식이 가장 우수하였으며, 붉은팥 원물 5% 첨가군에서도 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P가 증식하였으나 붉은팥 원물 3% 첨가군보다 증식이 낮게 나타났다. 붉은팥 원물 1% 첨가군에서도 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P가 증식하였으나, 3%, 5% 첨가군보다는 증식이 현저하게 낮아 붉은팥 원물 1% 첨가하는 발효에 적합하지 않는 것으로 판단된다. 붉은팥 원물을 3% 첨가하는 것이 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P의 증식에 가장 적합한 농도로 판단된다. Lee 등(26)의 연구에서 블루베리의 발효에 따른 유산균 생육에 대한 배양시간별 생균수를 측정한 결과 배양시간 72시간까지 유산균이 증식하였고 96시간 이후부터는 증식이 감소한다고 보고하였으며, Park 등(27)의 복분자의 유산발효와 생리활성 평가 연구에서 최적 배양 시간은 72시간이 바람직하다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 붉은팥 원물을 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P를 이용하여 발효함에 따라 균수가 증가하는 결과는 붉은팥을 섭취하면 인체 장내에 유익한 미생물을 활성화시킬 수 있는 프리바이오틱스로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 2. Proliferation of *Vigna angularis* following *Bacillus subtilis* KCCM 11965P fermentation

Extract (%)	Fermentation period (h)		
	24	48	72
1	$0.9 \pm 0.4 \times 10^{7(1)}$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^7$	$1.2 \pm 0.4 \times 10^7$
3	$0.04 \pm 1.1 \times 10^7$	$7.0 \pm 1.0 \times 10^7$	$12.7 \pm 1.6 \times 10^7$
5	$0.04 \pm 0.1 \times 10^7$	$1.1 \pm 0.7 \times 10^7$	$11.6 \pm 0.2 \times 10^7$

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

총 폴리페놀 함량

천연물에 함유된 페놀성 화합물은 phenolic hydroxyl기를 갖고 있어 단백질 등 거대 분자들과 쉽게 결합하여 항산화, 항암, 항염증, 항알레르기 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 붉은팥 원물 1%, 3%, 5%와 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 3% (v/v)에 접종하여 0, 24, 48, 72시

간 배양한 후 총 폴리페놀 함량을 측정하였으며, 표준물질은 gallic acid를 사용하여 표준곡선으로 함량을 구하였다(Table 3). 붉은팥 원물 3% 첨가군에서 0시간 배양군 (0.18 ± 0.010 mg/mL)보다 24시간 배양한 군에서는 총 폴리페놀 함량이 0.19 ± 0.015 mg/mL으로 증가, 48시간 배양한 군 0.20 ± 0.019 mg/mL, 72시간 배양한 군 0.23 ± 0.007 mg/mL으로 증가하였다. 5% 첨가 군에서 0시간 배양군(0.18 ± 0.010 mg/mL)과 비교한 결과 배양시간 24시간(0.19 ± 0.015 mg/mL), 48시간(0.19 ± 0.012 mg/mL)에는 총 폴리페놀 함량이 증가하지 않았으나 72시간 배양한 군에서는 0.24 ± 0.009 mg/mL으로 증가하였다. *Bacillus subtilis* KCCM 11965P를 이용한 붉은팥의 발효는 배양시간이 증가함에 따라 총 폴리페놀 함량도 증가하였다. 하지만 1% 첨가 배양한 군에서는 48시간까지는 총 폴리페놀 함량이 증가하지 않았으나 72시간 배양군에서는 약 22% 증가(0.11 ± 0.008 mg/mL)하였다. 이는 발효에 의하여 미생물이 2차 대사과정을 통해 새로운 형태의 물질로 전환된 것으로 판단된다. 기존의 연구에서도 천연물을 발효하면 총 페놀성 화합물 함량이 증가한다고 보고되었으며(28). Jung 등(12)의 연구보고에서는 대추를 *Bacillus subtilis*(37°C, 24 h)로 발효하면 폴리페놀 함량이 약 52% 증가한다는 연구결과와 일치하였다. 당유자 과피와 효모를 이용하여 발효하면 플라보노이드 화합물이 전환되어 항산화활성이 증가한다는 연구 결과와도 일치하였다(29). *Bacillus subtilis* KCCM 11965P를 이용한 붉은팥 발효물은 총 폴리페놀 함량을 증가시키므로 인체 내에서 항산화 활성을 갖는 식품소재로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. Total polyphenol contents of *Bacillus subtilis* KCCM 11965P fermentation of *Vigna angularis*

Extract (%)	Fermentation period (h)			
	0	24	48	72
1	$0.09 \pm 0.005^{1(a2)}$	0.09 ± 0.003^a	0.10 ± 0.006^b	0.11 ± 0.008^b
3	0.18 ± 0.010^a	0.19 ± 0.015^a	0.20 ± 0.019^a	0.23 ± 0.007^b
5	0.19 ± 0.005^a	0.19 ± 0.015^b	0.19 ± 0.012^b	0.24 ± 0.009^c

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

²⁾The means followed by same letter in the same column are not significantly different according to ANOVA and Tukey's multiple comparison tests (p<0.05).

DPPH 라디칼 소거 활성

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼은 화학적으로 유도되는 안정한 라디칼로 반응계에서 전자를 공여 받으면 고유의 자색이 없어져 측정이 간편하면서도 신뢰성이 높은 장점을 가지고 있어 식품의 기능성 평가 등 다양한 분야에서 이용되고 있다. 붉은팥 원물 1%, 3%, 5%와 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 3% (v/v)에 접종하여 0, 24, 48, 72시간 배양한 후 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다(Table 4). 붉은팥을 발효함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성

도 증가하였다. 붉은팥 원물 3% 첨가한 후 72시간 배양한 군에서 0시간 배양군(36.1±6.0%)보다 63.6±5.2%로 증가하였으며, 48시간 배양 60.5±4.9% 증가, 24시간 배양 54.3±1.8% 증가하였다. 1% 첨가 0시간 배양군(41.7±5.0%)보다 72시간 배양한 군에서 70.7±3.4%로 증가, 48시간 배양 68.7±1.6% 증가, 24시간 배양 65.8±3.4% 증가하여 발효시간이 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성도 증가하였다. 하지만 5% 첨가군에서도 발효함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성도 증가하였으나 발효시간 24시간 이후에서는 DPPH 라디칼 소거활성이 감소하는 경향으로 나타났다. *Bacillus subtilis* KCCM 11965P는 붉은팥을 발효하는데 적합한 균주로 판단된다. 기존의 연구결과에서 콩비지를 *Bacillus subtilis*를 이용하여 전통적인 방법으로 발효시켰을 때 발효기간 증가에 따라 DPPH 라디칼 소거능 등 항산화 활성이 증가하였고(30), 대추를 발효하면 항산화 활성성분인 총 폴리페놀과 항산화 활성이 증가한다는 연구결과와 일치하였다(12). *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 이용한 붉은팥 발효물은 DPPH 라디칼 소거 활성을 증가시키므로 인체의 항산화 활성을 증가시킬 수 있는 프리바이오틱스 소재로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. DPPH radical scavenging activity of *Vigna angularis* fermented by *Bacillus subtilis* KCCM 11965P

Extract (%)	Fermentation period (h)			
	0	24	48	72
1	41.7±5.0 ^{1a2)}	65.8±3.4 ^b	68.7±1.6 ^b	70.7±3.4 ^b
3	36.1±6.0 ^a	54.3±1.8 ^b	60.5±4.9 ^b	63.6±5.2 ^b
5	24.4±3.8 ^a	48.4±2.0 ^b	40.1±5.7 ^b	36.0±4.0 ^b

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.
²⁾The means followed by same letter in the same column are not significantly different according to ANOVA and Tukey's multiple comparison tests (p<0.05).

Protease 활성

Protease는 단백질 분해능이 우수하여 protease 활성이 있는 소재는 식품, 제약 등에 다양하게 이용되고 있다. 붉은팥 원물 1%, 3%, 5%와 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 3% (v/v)에 접종하여 0, 24, 48, 72시간 배양한 후 protease활성을 측정하였다(Table 5). 붉은팥 원물 5% 첨가한 후 24시간 배양한 군에서 1.29±0.002 unit/mL으로 측정되었으며, 48시간 배양군에서 2.34±0.004 unit/mL으로 증가하였고, 72시간 배양한 군에서 2.69±0.003 unit/mL으로 증가하였다. 이는 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 발효에 의하여 protease가 증가한 것으로 판단된다. 하지만 붉은팥 원물 1%, 3% 첨가군에서는 protease가 측정되지 않았다. Mann 등(31)의 연구 보고에 의하면 *Bacillus subtilis*로 발효하면 protease 활성이 일정기간동안에는 활성이 증가하다가 6일 이후 미생물의

성장이 감소하면서 활성도 감소된다고 보고하였다. 일반적으로 protease가 활성화되면 청국장 단백질 분해 특유의 구수한 맛 성분과 영양을 유리하고 유리아미노산 함량에 많은 영향을 주는 요인으로서 청국장 품질을 나타내는 중요한 지표가 된다고 보고되었다(32). 이와 같이 붉은팥은 protease를 활성화시켜 장내 유용미생물 성장을 도와 장 건강을 증진시킬 수 있는 식품소재로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 5. Protease activity of *Vigna angularis* fermented by *Bacillus subtilis* KCCM 11965P

Samples (%)	Fermentation period (h)			
	0	24	48	72
1	ND ¹⁾	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
5	ND	1.29±0.002 ^{2b3)}	2.34±0.004 ^c	2.69±0.003 ^c

¹⁾ND, not detected.
²⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.
³⁾The means followed by same letter in the same column are not significantly different according to ANOVA and Tukey's multiple comparison tests (p<0.05).

α-Amylase 효소 활성

붉은팥 원물 1%, 3%, 5%와 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 3% (v/v)에 접종하여 0, 24, 48, 72시간 배양한 후 α-amylase 활성을 측정하였다(Table 6). 붉은팥을 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P로 발효하면 발효시간이 증가함에 따라 α-amylase 활성이 증가하였고, 붉은팥 원물 첨가량이 증가함에 따라 α-amylase 활성도 증가하였다. α-Amylase 활성이 가장 높게 증가된 실험군은 붉은팥 원물 5% 첨가한 후 72시간 배양한 군에서 0시간 배양군(1.0±0.1 unit/mL)보다 26.0±0.2 unit/mL로 증가하였으며, 48시간 배양군 25.7±0.3 unit/mL, 24시간 배양군 15.0±1.6 unit/mL로 증가하였다. 3% 첨가 72시간 배양한 군에서는 0시간 배양군(1.3±0.2 unit/mL)보다 26.7±2.0 unit/mL로 증가, 48시간 배양군 25.3±0.6 unit/mL, 24시간 배양군 15.3±0.6 unit/mL로 증가하였다. 1% 첨가 72시간 배양한 군에서 0시간 배양군(6.0±1.3 unit/mL)보다 10.7±0.3 unit/mL 증가, 48시간 배양군 10.0±0.3 unit/mL, 24시간 배양 110.0±0.3 unit/mL으로 다른 첨가군보다 α-amylase 활성이 가장 낮게 증가하였다. 이러한 결과는 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P가 증식함에 따라 amylase 활성이 증가하는 것으로 판단된다. Mann 등(31)의 연구에서 *Bacillus subtilis* CBD2 이용한 곡류 발효에서 배양시간이 증가함에 따라 amylase 활성도 증가한다는 연구결과와 일치하였다. *Bacillus subtilis* KCCM 11965P로 발효한 붉은팥은 α-amylase 활성화 시켜 인체 내에서 탄수화물 소화를 이롭게 하는 장 건강에 유익한 식품소재로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 6. Amylase activity of *Vigna angularis* fermented by *Bacillus subtilis* KCCM 11965P

Extract (%)	Fermentation period (h)			
	0	24	48	72
1	6.0±1.3 ^{1)a2)}	10.0±0.3 ^b	10.0±0.3 ^b	10.7±0.3 ^b
3	1.3±0.2 ^a	15.3±0.6 ^b	25.3±0.6 ^c	26.7±2.0 ^c
5	1.0±0.1 ^a	15.0±1.6 ^b	25.7±0.3 ^c	26.0±0.2 ^c

¹⁾All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

²⁾The means followed by same letter in the same column are not significantly different according to ANOVA and Tukey's multiple comparison tests ($p < 0.05$).

유리아미노산 분석

필수 아미노산은 인체 내에서 합성되지 않으므로 식품으로 반드시 섭취해야 하고, 비필수 아미노산은 인체 내에서 합성이 가능한 아미노산으로 인체 내 단백질 합성을 위해서는 필수 아미노산과 비필수 아미노산 모두 필요하다. 이에 따라 붉은팥 원물 1%, 3%, 5%와 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 3% (v/v)를 접종하여 72시간 배양한 후 유리아미노산을 분석하였다(Table 7). 필수아미노산 중 leucine은 1% 첨가군에서 0시간 배양군 0.33 mg/L에서 3.26 mg/L로 증가하였고, 3% 첨가군에서 0시간 배양군 2.62 mg/L에서 10.97 mg/L로 증가, 5% 첨가군에서 0시간 배양군 5.22 mg/L에서 67.59 mg/L로 유리아미노산이 가장 많이 증가되었다. Methionine은 1% 첨가군에서 0시간 배양군 7.10 mg/L에서 12.94 mg/L로 증가하였고, 3% 첨가군에서 0시간 배양군 20.29 mg/L에서 29.65 mg/L로 증가하였으며, 5% 첨가군에서 0시간 배양군 29.13 mg/L에서 44.28 mg/L로 증가하였다. Phenylalanine은 1% 첨가군에서 0시간 배양군 4.21 mg/L로 분석되었으나 72시간 배양군에서는 분석되지 않았으며, 3% 첨가군에서 0시간 배양군 2.34 mg/L에서 8.37 mg/L로 증가하였으며, 5% 첨가군에서 0시간 배양군 10.95 mg/L에서 23.57 mg/L로 증가하였다. Valine은 붉은팥 원물 모든 첨가군에서 0시간 배양군에는 분석되지 않았으며, 72시간 배양한 군에서 붉은팥 원물 1% 첨가군에서 1.35 mg/L, 3% 첨가군 2.77 mg/L, 5% 첨가군 3.29 mg/L로 분석되었다. 비필수아미노산 중 cysteine은 1% 첨가군에서 0시간 배양군 6.77 mg/L에서 23.47 mg/L로 증가하였고, 3% 첨가군에서 0시간 배양군 6.11 mg/L에서 152.84 mg/L로 증가하였으며, 5% 첨가군에서 0시간 배양군 8.36 mg/L에서 403.78 mg/L로 증가하였다. Tyrosine은 1% 첨가군에서 0시간 배양군 2.00 mg/L에서 4.19 mg/L로 증가하였고, 3% 첨가군에서 0시간 배양군 4.00 mg/L에서 57.67 mg/L로 증가하였으며, 5% 첨가군에서 0시간 배양군 10.08 mg/L에서 259.35 mg/L로 증가하였다. Alanine은 3% 첨가군에서 0시간 배양군 4.31 mg/L에서 10.77 mg/L로 증가하였으나 5% 첨가군에서는 발효 이후에 감소하였다. Arginine은 1% 첨가군과 3%

첨가군에서 발효 이후에는 분석되지 않았으며, 5% 첨가군에서는 발효 이후에 감소하였다. 아미노산은 식품중 단백질의 질을 결정하게 되므로 아미노산의 함량은 인체 건강에 유익한 식품 성분이라 할 수 있으며, 총 섬유소 함량이 높으면 아미노산 조성 및 함량이 높아 영양학적으로 좋은 식품이라 할 수 있다(33). 붉은팥을 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P로 발효하면 아미노산이 증가하여 영양학적으로 가치가 높을 것으로 생각된다. 면역력 강화, 인체 활력 및 신진대사 증가 등의 효능을 지닌 아미노산의 증가는 인체 건강을 매우 이롭게 할 것으로 생각되며, 붉은팥은 프로바이오틱스를 활성화시킬 수 있는 프리바이오틱스 효능을 갖는 소재로 판단된다.

Table 7. Content of free amino acid by *Bacillus subtilis* KCCM 11965P fermentation of *Vigna angularis*

Free amino acid	(mg/L)					
	1%		3%		5%	
	FBE ¹⁾	FAF ²⁾	FBE	FAF	FBE	FAF
Valine	ND ³⁾	1.35	ND	2.77	ND	3.29
Leucine	0.33	3.26	2.62	10.97	5.22	67.59
Methionine	7.10	12.94	20.29	29.65	29.13	44.28
Phenylalanine	4.21	0.00	2.34	8.37	10.95	23.57
Alanine	1.07	ND	4.31	10.77	6.08	2.84
Tyrosine	2.00	4.19	4.00	57.67	10.08	259.35
Arginine	14.60	ND	29.06	ND	39.34	2.42
Cysteine	6.77	23.47	6.11	152.84	8.36	403.78

¹⁾FBE, fermentation before.

²⁾FAF, fermentation after.

³⁾ND, not detected.

유기산 분석

인체 내에서 젖산을 분해하는 효능이 있어 피로 회복과 스트레스 완화에 도움이 되며, 타액과 위액의 분비를 촉진시켜 음식물의 소화와 흡수를 돕는 유기산을 분석하였다. 붉은팥 원물 1%, 3%, 5%와 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 3% (v/v)를 접종하여 72시간 배양한 후 유기산을 분석하였다(Table 8). Oxalic acid은 1% 첨가군에서 0시간 배양군 0.02 mg/L에서 0.04 mg/L로 증가하였으며, 3% 첨가군에서 0시간 배양군 0.03 mg/L에서 0.10 mg/L로 증가, 5% 첨가군에서는 0.05 mg/L로 oxalic acid의 함량은 변화되지 않았다. Citric acid은 1% 첨가군에서 0시간 배양군 3.79 mg/L에서 0.03 mg/L로 감소되었고, 3% 첨가군에서 0시간 배양군 1.48 mg/L에서 0.26 mg/L로 감소, 5% 첨가군에서 0시간 배양군 2.50 mg/L에서 0.17 mg/L로 감소되었다. Malic acid은 1% 첨가군에서 0시간 배양군 0.62 mg/L에서 0.12 mg/L로 감소되었고, 3% 첨가군에서 1.48 mg/L에서 0.43 mg/L, 5% 첨가군에서 3.27 mg/L에서 1.10 mg/L로 감소되었다. *Bacillus*

subtilis KCCM 11965P를 이용하여 72시간 발효하면 대부분의 유기산은 감소하는 경향으로 나타났다. 이는 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P의 발효에 의하여 유기산 성분이 변화되는 것으로 판단된다.

Table 8. Content of organic acid by *Bacillus subtilis* KCCM 11965P fermentation of *Vigna angularis*

Organic acid	(mg/mL)					
	1%		3%		5%	
	FBE ¹⁾	FAF ²⁾	FBE	FAF	FBE	FAF
Oxalic acid	0.02	0.04	0.03	0.10	0.05	0.05
Citric acid	3.79	0.03	1.48	0.26	2.50	0.17
Malic acid	0.62	0.12	1.48	0.43	3.27	1.10
Succinic acid	ND ³⁾	0.19	0.02	0.01	0.01	0.73
Lactic acid	ND	0.36	ND	0.36	0.08	0.43
Formic acid	0.28	0.07	0.76	0.52	1.12	ND
Acetic acid	0.09	0.16	0.07	1.07	ND	1.12

¹⁾FBE, fermentation before.
²⁾FAF, fermentation after.
³⁾ND, Not detected.

요 약

장 건강에 유익한 프리바이오틱스 소재를 개발하기 위하여 배변을 촉진하는 효능을 지닌 붉은팥을 식품 발효에 이용되는 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P로 발효하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 붉은팥의 일반성분은 회분 3.35±0.04%, 조단백질 21.1±0.19%, 조지방 0.35±0.02% 함유되었다. 붉은팥 원물 1%, 3%, 5%와 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 3% (v/v)를 접종하여 0, 24, 48, 72시간 배양하였다. 배양액의 총균수를 측정한 결과 붉은팥 원물을 3% 첨가한 후 72시간 배양군에서 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P 발효가 가장 적합하였다. 발효 시간에 증가함에 따라 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하였다. Protease 활성은 붉은팥 원물 5% 첨가한 후 72시간 배양한 군(2.69±0.003 unit/mL)에서 활성이 가장 높았다. 발효시간과 붉은팥 원물 첨가 농도가 증가함에 따라 α-amylase 활성도 증가하였으며, 붉은팥 원물 5% 첨가한 후 72시간 배양한 군에서 0시간 배양군(1.0±0.1 unit/mL) 보다 26.0±0.2 unit/mL로 증가하였다. *Bacillus subtilis* KCCM 11965P로 72시간 배양한 후 유리아미노산을 측정한 결과 leucine은 붉은팥 원물 5% 첨가한 0시간 배양군 5.22 mg/L에서 67.59 mg/L로 증가하였으며, 비필수아미노산인 tyrosine은 5% 첨가 0시간 배양군 10.08 mg/L에서 259.35 mg/L로 증가하였다. 이와 같이 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P로 붉은팥을 발효하면 항산화 활성, protease 효소

활성, 및 α-amylase 효소 활성이 증가하였으며, 유리아미노산과 유기산이 증가하였다. 붉은팥을 발효하는데 *Bacillus subtilis* KCCM 11965P가 적합할 것으로 판단되며, 붉은팥은 프로바이오틱스를 활성화시켜 장 건강을 증진시킬 수 있는 프리바이오틱스 소재로 개발할 수 있는 가능성을 시사하였다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단-전통문화융합연구사업의 지원(과제번호 2016M3C1B5907203)을 받아 수행된 연구입니다

References

1. Park MR, Lee JJ, Kim AR, Jung HO, Lee MY (2010) Physicochemical composition of Ramie Leaves (*Boehmeria nivea* L.). Korean J Food Preserv, 17, 853-860
2. Shin EH (2010) Component analysis and antioxidant activity of *Kalopanax pictus* Leaf. J Korean Soc Food Sci Nutr. 39, 1634-1639
3. Kang MY, Jeong YH, Eun JB (2003) Identification and determination of dietary fibers in citron, jujube and persimmon. Korean J Food Preserv, 10, 60-64
4. Lim ES (2015) Optimal conditions and effects of prebiotics for growth and antimicrobial substances production of *Lactobacillus brevis* BK11. Korean J Microbio, 51, 288-299
5. Park BS (2008) Bifidogenic effects of inuloprebiotics in broiler chickens. J Life Sci. 18, 1693-1699
6. Chang BY, Han JH, Cha BS, Ann SH, Kim SY (2015) Optimization of culture condition for enhancing the probiotics functions. J Food Hyg Saf 30, 295-301
7. Shin S, Park SS, Lee HM, Hur JM (2014) Effects of fermented chicory fiber on the improvement of intestinal function and constipation. J Korean Soc Food Sci Nutr. 43, 55-59
8. Eun JB, Jung YM, Woo GJ (1996) Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of korean tangerine (*Citrus aurantium* var.). Korean J Food Sci Technol, 28, 371-377
9. Baek SY, Kim JY, Choi JH, Choi JS, Choi HS, Jeong ST, Yeo SH (2012) Assessment of the quality characteristics of mixed-grain *Nuruk* made with different fungal strains. J East Asian Soc Diet Life, 22, 103-108

10. Park NY, Lee SH (2017) Fermentative characteristics of yogurt using lactic acid bacteria isolated from Korean traditional fermented food. *Korean J Food Preserv*, 24, 707-713
11. Shin JY, Shin JH, Kang MJ, Choi MH, Park HR, Choi JS, Bae WY, Seo WT (2017) Physicochemical characteristics of lactic acid fermented *Seomaeyaksuk* (*Artemisia argyi* H) *Sikhye* added with different addition ratio of MSG. *Korean J Food Preserv*, 24, 254-265
12. Jung JE, Cho EJ (2014) Protective Effects of *Zizyphus jujuba* and Fermented *Zizyphus jujuba* from free radicals and hair loss. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 43, 1174-1180
13. Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Dayde J (2008) Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem*, 109, 709-721
14. Oboh G, Alabi KB, Akindahunsi AA (2008) Fermentation changes the nutritive value, polyphenol distribution, and antioxidant properties of *Parkia biglobosa* seeds (African locust beans). *Food Biotechnol*, 22, 363-376
15. Song EJ, Park SM, Wang Q, Lim JK (2014) Identification and characterization of protease-resistant proteins from adzuki beans. *Curr Res Agric Life Sci*, 32, 149-54
16. Hwang CS, Heong DY, Kim YS, Na JM, Shin DH (2005) Effects of enzyme treatment on physicochemical characteristics of small red bean percolate. *Korean J Food Sci Technol*, 37, 189-193
17. Kang SJ, Han YS (2012) Studies on the anti oralmicrobial activity and selected functional component of small red bean extract. *Korean J Food Cookery Sci*, 28, 41-49
18. Kim CK, Oh BH, Na JM, Shin DH (2003) Comparison of physicochemical properties of Korean and Chinese red bean starches. *Korean J Food Sci Technol*, 35, 551-555
19. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178
20. Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200
21. Kim MH, Rho JH, Kim MJ (2011) Stabilizing and optimizing properties of crude protease extracted from Korean figs. *Korean J Food Cookery Sci*, 27, 29-37
22. Bernfeld P (1955) Amylases α and β . methods in enzymology, *Methods in Enzymol*, 1, 149-158
23. Ohara I, Ariyoshi S (1979) Comparison of protein precipitants for the determination of free amino acid in plasma. *Agric Biol Chem*, 43, 1473-1478
24. Palmer JK, List DM (1973) Determination of organic acids in foods by liquid chromatography. *J Agric Food Chem*, 21, 903-906
25. Kim MJ, Kim KS (2005) Functional and chemical composition of *Hwanggumkong*, *Yakong* and *Huktae*. *Korean J Food Cookery Sci*, 21, 844-850
26. Lee DH, Hong JH (2015) Physicochemical properties and storage stability of blueberry fermented by lactic acid bacteria. *Korean J Food Preserv*, 22, 796-803
27. Park YS, Chang HG (2003) Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol*, 46, 367-375
28. Ferreres F, Gomes D, Valentao P, Goncalves R, Pio R, Chagas EA, Seabra RM, Andrade PB (2009) Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem*, 114, 1019-1027
29. Hyon JS, Kang SM, Han SW, Kang MC, Oh MC, Oh CK, Kim DW, Jeon YJ, Kim SH (2009) Flavonoid component changes and antioxidant activities of fermented *Citrus gradis* osbeck peel. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38, 1310-1316
30. Zhu YP, Fan JF, Cheng YQ, Li LT (2008) Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control*, 19, 654-661
31. Mann SY, Kim EA, Lee GY, Kim RU, Hwang DY, Son HJ, Lee BW, Lee CY, Kim DS (2013) Characteristics of *Chungkookjang* Produced by *Bacillus subtilis* MC31. *J Life Sci*, 23, 560-568
32. Ahn KJ (2009) Characterization and production of antibiotic by *Bacillus subtilis* 028-1, a *Chungkookjang* fermenting strain. *Korean J Microbiol*, 45, 185-192
33. Prak EJ, Jhon DY (2013) The nutritional composition of Bamboo shoots and the effects of fiber on intestinal microorganisms. *Korean J Food Cult*, 28, 502-511